

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Josip Vrančić

Prognostička i patogenetska uloga Nrf2 u
karcinomu pluća nemalih stanica

DIPLOMSKI RAD



ZAGREB, 2017.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Katedri za kliničku onkologiju, Medicinskog fakulteta, Sveučilište u Zagrebu pod vodstvom prof.dr.sc. Nikole Đakovića i predan je na ocjenjivanje u akademskoj godini 2016./2017.

ACR- akrolein	MDA- malondialdehid
ADH- alkohol dehidrogenaza	ME1- malični enzim 1
ALDH- aldehid dehidrogenaza	mRNA- glasnička RNK
ALK- kinaza anaplastičnih limfoma	NFkB- jezgreni faktor kapa, pojačivač lakih lanaca
AP- aktivirajući protein	Nrf2- nuclear-factor erythroid 2-related factor 2
ARE- antioksidativni element odgovora	NSCLC- karcinom pluća nemalih stanica
ATRA- sve-trans retinoična kiselina	PGD- 6-fosfoglukonat dehidrogenazu
CSC- tumorske matične stanice	PKC- protein kinaza C
Cys- cistein	PPAR- peroksisomski proliferatorima aktivirani receptori
EGFR- receptor epidermalnog faktora rasta	PUFA- višestruko nezasićene masne kiseline
GCL- glutamat cistein ligaza	RAR- receptor za retinoidne kiseline
GSH- glutation	RLIP- Ral-vezujući GTP-aza aktivirajući protein
GSTA- glutation-S-transferaza	ROS- reaktivni kisikovi radikali
H ₂ O ₂ - vodikov peroksid	SCLC- karcinom pluća malih stanica
HAT- histon acetil transferaze	SOD- superoksid dismutaza
HNA- 4-hidroksi-2- nonenoična kiselina	TBA- agensi koji vežu tubulin
HNE- 4-hidroksi-2-nonenal	Trx- tioredoksin
HO-1- hem-oksigenaza-1	TrxR- tioredoksin reduktaza
IDH1- izocitrat dehidrogenazu 1	WHO- Svjetska zdravstvena organizacija
MAL-A- malabrikon-A	
MAPK- aktivirajuća protein kinaza	

Sadržaj

Sažetak	V
Prognostička i patogenetska uloga Nrf2 u karcinomu pluća nemalih stanica	V
Summary	VI
Prognostic and pathogenetic role of Nrf2 in non-small cell lung cancer	VI
Karcinom pluća nemalih stanica	1
Oksidacijski stres i karcinogeneza.....	2
Nrf2	4
Antioksidacijska zaštita.....	8
Uloga Nrf2 u karcinogenezi	10
Uloga Nrf2 u regulaciji staničnog rasta.....	10
Nrf2 i regulacija apoptoze	10
Mutacije Nrf2 i Keap1 u karcinomu pluća nemalih stanica	12
Epigenetske modifikacije ekspresije i posttranskripcijska regulacija	12
Nrf2 i autofagija	13
Utjecaj izražaja Nrf2 i Keap1 na prognozu karcinoma pluća nemalih stanica.....	13
Nrf2 kao meta terapije NSCLC	15
Zaključak.....	16
Zahvale	17
Literatura	17
Životopis.....	27

Sažetak

Prognostička i patogenetska uloga Nrf2 u karcinomu pluća nemalih stanica

Josip Vrančić

U Republici Hrvatskoj u 2014. godini, karcinom traheje, bronha i pluća činio je 19% novih slučajeva karcinoma kod muškaraca i 8% kod žena. Time je karcinom traheje, bronha i pluća bio na prvom mjestu po učestalosti u sijela novodijagnosticiranih novotvorina u muškaraca i na drugom mjestu u žena. Spomenuti karcinom uzrokovao je 26% smrti u muškaraca i 12% u žena u ukupnoj stopi mortaliteta od raka, od čega na karcinom pluća nemalih stanica (NSCLC) otpada preko 80% dijagnoza i 85% smrtnosti.

Oksidacijski stres je važan čimbenik u karcinogenezi, a uzrok povećanog oksidacijskog stresa u tumoru mogu biti radioterapija, kemoterapija te upala. Krajnji produkt lipidne peroksidacije, reaktivni aldehid 4-hidroksi-2-nonenal (HNE), smatra se drugim glasnikom oksidacijskog stresa. HNE modificira metabolizam i signalne puteve tumorskih stanica promjenama aktivnosti proteina i reakcijama s lipidima i DNK.

Nrf2 je primarni senzor i regulator odgovora na oksidacijski stres, a ujedno je i transkripcijski faktor koji svojim djelovanjem regulira metabolizam ksenobiotika, te je poznata njegova dvojna uloga u nastanku malignih oboljenja. U fazi karcinogeneze Nrf2 djeluje protektivno na stanice te sprječava malignu alteraciju stanica. U poodmaklim stadijima bolesti njegova povećana aktivnost uzrokuje otpornost stanica karcinoma na kemoterapiju i radioterapiju. Također je poznat kao jedan od mehanizama koji stanicama karcinoma omogućava nesmetano dijeljenje i izbjegavanje programirane stanične smrti. U karcinomu pluća nemalih stanica detektirane su brojne genetske i epigenetske promjene koje uzrokuju povećanu aktivnost Nrf2. Učestalost genetskih i epigenetskih promjena iznosi i preko 50%, a povišena aktivnost Nrf2 se detektira u više od polovice uzoraka na imunohistokemijskoj analizi tkiva.

Kako su usprkos napretku ishodi liječenja NSCLC terapijskim režimima poput platine, koji se baziraju na indukciji oksidacijskog stresa u stanicama i dalje loši, propituje se uloga Nrf2 kao čimbenika koji bi ukazivao na lošiju prognozu i potrebu za promjenom terapijskog pristupa. Terapija temeljena na inhibiciji Nrf2 još uvijek je u povojima zbog nedostatka specifičnih inhibitora, iako takva terapija predstavlja atraktivnu metu, kao dopunu konvencionalnim terapijskim režimima.

Ključne riječi: Nrf2, karcinom pluća nemalih stanica, NSCLC, oksidacijski stres, kemorezistencija

Summary

Prognostic and Pathogenetic Role of Nrf2 in Non-Small Cell Lung Carcinoma

Josip Vrančić

In the Republic of Croatia in 2014, trachea, bronchus and lung cancer contributed to 19% of new cancer cases in males, and 8% in females. That made trachea, bronchus and lung carcinoma the most commonly diagnosed neoplasm in males, and the second one in females. Trachea, bronchus and lung cancer caused 26% of deaths in males, and 12% in females in the total cancer mortality rate. Non-small lung cancer accounts for over 80% of diagnosis and 85% of mortality.

Lipid peroxidation end product, a reactive aldehyde 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), is considered to be the second messenger of oxidative stress. HNE modifies the metabolism of cancer cells by interacting with proteins, lipids and DNA.

Nrf2 is the primary sensor and regulator of oxidative stress response, and it is also a transcription factor that regulates the metabolism of xenobiotics by its action, and it has been recognized for its dual role in the emergence of malignant diseases. During carcinogenesis Nrf2 acts protective, and prevents malignant alteration. In the advanced stages of the disease, its increased activity causes cancer cells resistance to chemotherapy and radiotherapy. It is also known as one of the mechanisms that allows cancer cells unhindered growth and enables them to escape programmed cell death. In the NSCLC, numerous genetic and epigenetic alterations that cause increased activity of Nrf2 have been detected. The frequency of genetic and epigenetic alterations is over 50%, and increased Nrf2 activity is detected in more than half of tissue samples on immunohistochemistry.

Despite the progress, NSCLC outcomes of the treatment with therapeutic regimes such as platinum, whose action is based on oxidative stress induction in the cells are still poor, the role of the Nrf2 as a factor indicating poor prognosis and the need for change in therapeutic approach is questioned. Because of the lack of specific inhibitors, therapy based on Nrf2 inhibitors is still in its beginning, although that kind of therapy presents an attractive target, as a complement to conventional therapeutic regimens.

Keywords: Nrf2, non-small cell lung carcinoma, NSCLC, oxidative stress, chemoresistance

Karcinom pluća nemalih stanica

Ukupan broj bolesnika dijagnosticiranih s invazivnim rakom u 2014. godini u Hrvatskoj bio je 21 434, a broj umrlih od raka te godine bio je 13 939. Karcinom traheje, bronha i pluća činio je 19% novih slučajeva karcinoma kod muškaraca i 8% kod žena. Time je karcinom traheje, bronha i pluća bio na prvom mjestu po učestalosti u sijela novodijagnosticiranih novotvorina u muškaraca i na drugom mjestu u žena. Karcinom traheje, bronha i pluća uzrokovao je 26% smrti od raka u muškaraca i 12% u žena (1).

U klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) iz 2015. godine, epitelni tumori pluća histološki su podijeljeni u deset glavnih skupina: adenokarcinom, karcinom pločastih stanica, neuroendokrine tumore, karcinom velikih stanica, adenoskvamozni karcinom pluća, karcinomi po tipu žlijezda slinovnica, sarkomatoidni karcinomi, papilomi, adenomi i na koncu skupinu drugih i neklasificiranih karcinoma (2). Za potrebe liječenja i kliničku praksu karcinomi pluća se dijele u skupinu karcinoma pluća nemalih stanica- NSCLC (od eng. non-small cell lung carcinoma) i karcinom pluća malih stanica- SCLC (od eng. small cell lung carcinoma) (3).

Najvažniji pripadnici skupine karcinoma pluća nemalih stanica su adenokarcinom, karcinom pločastih stanica i karcinom velikih stanica, i oni zajedno čine preko 80% dijagnosticiranih slučajeva karcinoma pluća (3).

Stratifikacija i odabir terapije za pacijente s NSCLC uglavnom ovisi o radiološkoj i patohistološkoj dijagnostici kao standardima u kliničkoj praksi. S napretkom spoznaja i tehnologije molekularne dijagnostičke metode su postupno inkorporirane u ovaj proces. Opće prihvaćeni onkogeni faktori poput KRAS, EGFR (od eng. epidermal growth factor receptor), ALK (od eng. anaplastic lymphoma kinase), ROS i BRAF se sve više sekvencioniraju i detektiraju kao dio standardne dijagnostičke procedure. Također, odabir terapije postaje sve ovisniji o molekularnoj osnovi karcinoma (5).

Pacijenti oboljeli od NSCLC biti će podvrgnuti kombinaciji kirurškog liječenja, kemoterapije i/ili radioterapije, ovisno o stadiju bolesti, operabilnosti i općem stanju(6). Kemoterapija je danas važna komponenta liječenja u svim stadijima bolesti, od ranih stadija bolesti pa do kasnijih neoperabilnih stadija, kada je ona osnova liječenja. Nažalost, većina (55%) pacijenata prilikom dijagnoze već ima metastaski oblik bolesti. Terapija bazirana na platini je osnova kemoterapije NSCLC i obično se daje u kombinaciji s agensima koji vežu tubulin (TBA), uključujući taksane (paklitaksel, docetaksel), vinka alkaloida (vinorebelin, vinkristin), kaptotecinske analoge (irinotekan, topotekan), te u kombinaciji s gemcitabinom i pemetreksedom (7).

Učinkovitost kemoterapije, točnije režima baziranih na cisplatini, privukla je pozornost 1995. godine kada je za pacijente podvrgnute adjuvantnoj kemoterapiji utvrđen statistički neznačajan utjecaj na petogodišnje preživljenje u usporedbi s pacijentima koji su liječeni samo kirurški (5%, $p=0.08$) (8).

Adjuvatna kemoterapija je usprkos kontroverzama s godinama postala standard liječenja NSCLC, pogotovo s napretkom molekularne dijagnostike i terapijskih opcija. S druge strane, uloga postoperativne radioterapije ostaje kontroverzna te se čini da su pozitivni efekti ograničeni na pacijente u stadiju I i II bolesti (9).

Kako su usprkos napretku ishodi liječenja NSCLC terapijskim režimima poput platine, koji se baziraju na indukciji oksidacijskog stresa u stanicama (11) i dalje loši, postavlja se pitanje kako prepoznati i liječiti pacijente s lošim odgovorom na kemoterapiju.

Oksidacijski stres i karcinogeneza

Oksidacijski stres je poremećaj u staničnoj redoks ravnoteži te je često uzrokovan reaktivnim kisikovim vrstama (ROS od eng. reactive oxygen species). ROS se definiraju kao kemijske vrste, radikali i spojevi, koji sadrže kisik i odlikuje ih visoka reaktivnost. Uključuju superoksidni ($O_2^{\cdot-}$) i hidroksilni (HO^{\cdot}) radikal, kao i neke ne-radikale, primjerice vodikov peroksid (H_2O_2) (11). Najvažniji endogeni izvori ROS-a su mitohondriji, stanična membrana, endoplazmatski retikulum i peroksisomi. Nastanak ROS-a veže se uz široku lepezu mehanizama koja uključuje enzimske reakcije i izvanjske stimulanse poput ionizirajućeg zračenja, ultraljubičastog dijela spektra, duhanskog dima, infekcija, okolišnih toksina i izloženosti herbicidima/insekticidima. Oksidacijski stres upleten je u brojna patološka stanja organizma uključujući upalu, aterosklerozu, neurodegenerativne bolesti i rak.

Stanice raka odlikuje povećana anaerobna glikoliza (Warburgov efekt) i visoka razina oksidacijskog stresa. Visoka razina oksidacijskog stresa je posljedica nakupljanja reaktivnih kisikovih vrsta kao rezultat disbalansa između njihova stvaranja i uklanjanja. Visoka koncentracija ROS-a, a time i reaktivnih aldehida, posljedica je promjena više signalnih puteva koje se odražavaju na metabolizam stanica raka. Te visoke koncentracije ROS neutraliziraju se povećanim antioksidacijskim obrambenim mehanizmima stanica raka (11).

U kontekstu staničnog metabolizma, jasno je da se stanice raka adaptiraju na disbalans u redoks statusu, koji je uzrokovan njihovim ubrzanim rastom i ograničenom dostupnošću kisika i nutrijenata. Upravo te prilagodbe i alternativne metaboličke reakcije koje se razvijaju na taj način čine ih manje osjetljivima na kemoterapiju i zračenje (12).

ROS su također upletene u obnovu i diferencijaciju normalnih matičnih stanica (13). Iako matične stanice karcinoma dijele sličan fenotip s normalnim matičnim stanicama, relativno se malo zna o njihovom redoks-statusu. Istraživanja su pokazala da matične stanice karcinoma dojke i jetre imaju nešto niže razine ROS-a zbog povećane ekspresije sustava zaduženih za njihovo odstranjivanje (13,14). Kako je ekspanzija tumorskih matičnih stanica nužna za prve faze formiranja tumora, održavanje niskih razina

ROS je ključno za preživljenje pre-neoplastičnih fokusa. Također, iako su terapijski režimi koji povećavaju produkciju ROS-a korisni za eliminaciju većine tumorske mase, takvi pristupi mogu zakazati u konačnom cilju tj. izlječenju pacijenta upravo zbog superiorne sposobnosti tumorskih matičnih stanica da prežive uvjete visoke razine ROS-a povećanjem produkcije enzimatskih i neenzimatskih antioksidansa. Dodatno, takvi terapijski režimi stvaraju plodno tlo za daljnje oštećenje DNA i nastanak mutacija, što u konačnici može rezultirati rezistentnim tumorskim stanicama (15).

ROS ulaze u reakcije sa svim staničnim molekulama, a lipidi su posebno osjetljivi. Lipidna peroksidacija je proces tijekom kojeg oksidansi napadaju dvostruke veze ugljika u lipidima, a posebno su osjetljive višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA od eng. polyunsaturated fatty acids). Čitav proces lipidne peroksidacije odvija se u tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija. U kaskadi reakcija nastaju lipidni peroksilni radikali i hidroperoksidi. Krajnji rezultat lipidne peroksidacije je velik broj produkata, reaktivnih aldehida, među kojima se malondialdehid (MDA), 4- hidroksinonenal (HNE) i akrolein (ACR) smatraju biološki najznačajnijima.

Za razliku od kratkoživućih ROS, reaktivni aldehidi su dugoživući, vodotopivi spojevi, koji imaju sposobnost difuzije s mjesta nastanka čime obnašaju ulogu „drugih glasnika oksidacijskog stresa“ (15).

HNE je najistraživaniji predstavnik 4-hidroksialkenala koji nastaje peroksidacijom omega-6 masnih kiselina (16), među koje se ubraja i arahidonska kiselina. Otkriven je 60-ih godina prošlog stoljeća, dok je u 80-ima privukao interes kao citotoksični produkt peroksidacije mikrosomskih lipida jetre. Nastavak istraživanja pokazao je kako reaktivni aldehidi imaju značajan genotoksičan efekt u ljudi (17). Danas se zna da HNE može kovalentno modificirati brojne makromolekule kao što su DNA i proteini (16). Interakcije s proteinima su posebno zanimljive jer mogu izazvati dugoročne promjene u stanici kada HNE reagira s transkripcijskim faktorima osjetljivima na stres poput: Nrf2, AP-1, NFkB i PPAR te ovisno o koncentraciji i biološkim uvjetima može potaknuti proliferaciju/diferencijaciju, autofagiju, nekrozu ili apoptozu (17).

Utjecaj HNE-a na transkripcijske faktore osjetljive na stres poput Nrf2 (nuclear-factor erythroid 2-related factor 2), AP-1 (activating protein-1), NFkB, PPAR (peroxisome-proliferator-activated receptors) omogućava stanicama adaptaciju i efikasnu obranu od stresora. HNE također modulira i utječe na mitogen-aktivirajuću protein kinazu, signalni put receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR/Akt signalni put), te modulira aktivnost protein kinaze C (PKC) i tako ostvaruje svoju široku lepezu aktivnosti i utjecaja na ključne puteve staničnog preživljenja, proliferacije i diferencijacije (15,16,17).

Nrf2

Mnoge su nezavisne studije potvrdile HNEom uzrokovanu indukciju aktivnosti Nrf2 kao primarni senzor i regulator odgovora na oksidacijski stres (18,19,20,21,22,23).

U fiziološkim uvjetima Nrf2 je u citoplazmi vezan na represorski protein Keap1, čime se ubikvitira Cul3-Keap1 ubikvintin E3 ligaznim kompleksom što dovodi do posljedične brze razgradnje u proteasomima. Prilikom izlaganja stanice oksidacijskom stresu i elektrofilnim molekulama, dolazi do modifikacije reaktivnih cisteinskih ostataka Keap1 i promjene konformacije kompleksa te dolazi do otpuštanja Nrf2, translokacije u jezgru i transkripcije mnogih citoprotektivnih gena. Svaki od potonjih gena navedenih u tablici 1 sadržava barem jedan antioksidativni element odgovora (ARE-antioxidative response element), tj 5'-A/GTGAC/GNNNGCA/G-3' sekvencu u promotoru (24). Glavni geni koji podliježu indukciji od strane HNE-Nrf2-ARE su:

1. Hem-oksigenaza-1 (HO-1), antioksidacijski protein koji katalizira pretvorbu hema u biliverdin, nakon čega slijedi pretvorba potonjeg u bilirubin. I biliverdin i bilirubin imaju važna antioksidacijska svojstva, a dokazana je povišena aktivnost HO-1 kao posljedica izloženosti HNEu.
2. Tioredoksin (Trx) i tioredoksin reduktaza (TrxR); Trx je mali ubikvitarni antioksidacijski protein s dva cisteinska (Cys) ostatka u katalitičkoj regiji, a TrxR je NADPH ovisni enzim zadužen za redukciju Trx u njegov aktivan oblik. Dokazana je uloga HNE kao induktora aktivnosti sustava Trx/TrxR.
3. Glutamat cistein ligaza (GCL); enzim zadužen za najvažniji korak u sintezi GSH, također je podložan indukciji putem sustava HNE-Nrf2
4. Aldo-keto reduktaze/AKR (17)

Osim što kontrolira ekspresiju glutamat-cistein ligaze, Nrf2 također kontrolira dostupnost cisteina unutar stanica. Potonje je posljedica povećane ekspresije SCL7A11 gena, koji kodira cistin-glutamatni transporter XCT. U izmjeni koju katalizira XCT, glutamat izlazi, a cistin ulazi u stanicu. Cistin se dalje reducira u cistein, što je katalizirano tioredoksin-reduktazom ili GSH ovisnim sustavom. Također, cistein je zajedno sa selenom u formi selenocisteina, dio aktivnog katalitičkog mjesta tioredoksin-reduktaze i glutation-peroksidaze. XCT je stabiliziran od strane CD44, površinskog s tumorima povezanog antigena, koji je ujedno i marker matičnih stanica karcinoma (11).

Iako je zaštita stanica koju Nrf2 pruža važna za prevenciju karcinogeneze u normalnim tkivima, u stanicama s razvijenim punim malignim obilježjima, Nrf2 predstavlja prednost u ubrzanom malignom rastu pružajući rezistenciju na kemoterapiju (25).

Opisano je nekoliko mehanizama koji dovode do konstitutivne aktivacije Nrf2:

1. Somatske mutacije Keap1, ili mutacije u Keap1-vežućoj domeni na Nrf2 koje ometaju njihovu interakciju

2. Epigenetske modifikacije ekspresije Keap1 koje dovode do neadekvatne represije i razgradnje Nrf2
3. Akumulacija disruptorskih proteina poput p62, koji posljedično uzrokuju disocijaciju Nrf2-Keap1 kompleksa
4. Indukcija transkripcije Nrf2 onkogenima K-Ras, B-Raf i C-Myc
5. Posttranslacijske modifikacije cisteinskih ostataka Keap1 suksinilacijom (uočeno u obiteljskom papilarnom karcinomu bubrega uzrokovanom gubitkom funkcije enzima fumarat-hidrataze) (25-33)

Konstitutivna aktivacija transkripcijskog faktora Nrf2 uzrokuje povećanu ekspresiju gena povezanih s metabolizmom lijekova, te tako povećava rezistenciju stanica na kemoterapiju i zračenje.

U tablici 1. prikazani su geni čiju transkripciju pozitivno regulira Nrf2.

Tablica 1. **Geni pozitivno regulirani od strane Nrf2 u ljudi:**

	Simbol	Ime	Ref
Detoksikacija- prva faza: oksidacija, redukcija ili hidroliza lijekova	AKR1B1	aldo-keto reduktaza, obitelj 1, član B1 (i 1B8 i 1B10)	(34,35)
	AKR1C1	aldo-keto reduktaza, obitelj 1, član C1 (i 1C2 i 1C3)	(34,35)
	ALDH3A1	aldehid dehidrogenaza, obitelj 3, član A1 (i 3A2)	(35,36)
	CBR1	karbonil reduktaza 1 (i 3)	(35)
	EPHX1	epoksid hidrolaza 1, mikrosomalna	(35,36)
	PTGR1	prostaglandin reduktaza 1	(34,35)
	NQO1	NAD(P)H: kinon oksidoreduktaza	(34,35,36)
Detoksikacija- druga faza: konjugacija lijevkova	MGST1	mikrosomalna glutathion-S- transferaza 1 (i 2)	(35,36)
	SULT1A1	sulfotransferazna obitelj, citosolna forma, član 1 (i 2)	(35)
	UGT1A1	UDP glukuronoziltransferaza, obitelj 1, član A1 (i 1A6)	(35)
	UGT2B7	UDP glukuronoziltransferaza, obitelj 2, član B7 (i 2B34)	(35,36)
Detoksikacija- faza 3: transport	ABCB6	ATP–vežući kazetni transporter, obitelj B (MDR/TAP), član 6	(37)
	ABCC2	ATP–vežući kazetni transporter, obitelj C (CFTR/MRP), član 2	(35,36,37)
	ABCC3	ATP–vežući kazetni transporter, obitelj C CFTR/MRP), član 3	(36)
Antioksidacijski mekanizmi: GSH sustav	GCLC	glutamat-cistein ligaza, katalitička podjedinica	(34,35,36,37)
	GCLM	glutamat-cistein liigaza, modificirajuća podjedinica	(35,36,37)
	GGT1	gama-glutamil transferaza	(35)
	GLRX	glutaredoksin	(35)
	GLS	glutaminaza	(35)
	GPX2	glutathion peroksidaza 2	(35)
	GSR1	glutathion reduktaza	(34,35,36)
	SCL7A11	cistin-glutamatni transporter (XCT)	(34,36)

Antioksidacijski mehanizmi: Trx sustav	PRDX6	peroksiredoksin 6	(36,37)
	SRXN1	sulfiredoksin 1	(34,35)
	TXN1	tiorredoksin 1	(36,37)
	TXNRD1	tiorredoksin reduktaza 1	(34,35,36,37)
Metabolizam ugljikohidrata i redukcija NADPH	G6PD	glukoza-6- fosfat 1 dehidrogenaza	(34,35,36,37)
	HDK1	heksokinaza, domena 1	(35)
	ME1	malični enzim 1, NADP+ -ovisan, citosolna forma	(34)
	PGD	6-fosfoglukonat dehidrogenaza	(34,35,36)
	TALDO1	transaldolaza	(35)
	TKT	transketolaza 1	(35)
	UGHD	UDP- glukoza dehidrogenaza	(35)
Metabolizam željeza i hema	BLVRA	biliverdin reduktaza A	(35)
	BLVRB	biliverdin reduktaza B [flavin reduktaza (NADPH)]	(35,36)
	FECH	feroketolaza	(36)
	FTH1	ferritin, polipeptid velike molekularne mase 1	(34,35,36,37)
	FTHL12	ferritin, nalik polipeptidu velike molekularne mase 12	(34,35)
	FTHL17	ferritin, nalik polipeptidu velike molekularne mase 17	(35)
	FTL1	ferritin, polipeptid male molekularne mase	(34,35,36)
	HMOX1	hem oksigenaza	(34,35,36,37)
Transkripcijski faktori i povezani proteini	MAFG	MafG protein	(34,37)
	PPARG	peroksisomski proliferacijskim signalom aktivirani receptor gama (PPARY)	(38,39)
	PPARGC1B	peroksisomski proliferacijskim signalom aktivirani receptor gama (PPARY), koaktivator beta	(38)
	RXRA	retinoidni X receptor alfa (RXR α)	(38,39)
Supstratni adapter ubikvintin ligaze	KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein 1	(38)

Antioksidacijska zaštita

Kako bi se učinkovito zaštitile od štetnih učinaka oksidacijskog stresa, stanice su razvile raznovrsne mehanizme obrane koje u praktične svrhe možemo podijeliti na neenzimatske i enzimatske.

Superoksid dismutaze (SOD) su prva linija obrane od superoksidnih aniona. Mn-SOD lokalizirana je u mitohondrijskom matriksu, dok je ZnCu-SOD u citoplazmi. Izvanstanična izoforma SOD (EC-SOD), izlučuje se van stanica u obliku homotetramera, a u plućima se vezuje uz područja s visokim sadržajem kolagena tipa I poput intralveolarnih septa. Snižena aktivnost CuZn superoksid dismutaze često se pronalazi u tumorima, te daje naslutiti kako bi snižena obrana zajedno s njihovom povećanom produkcijom ROS-a mogla biti jedan od ključnih koraka u karcinogenezi (40).

Vodikov peroksid, proizveden enzimatskim djelovanjem SOD ili oksidaza poput ksantin oksidaze, reducira se do vode djelovanjem katalaze i glutation-peroksidaze. Katalaza, jedan od najefikasnijih enzima uopće, najzaslužnija je za brzu razgradnju vodikova peroksida (41) te privlači pozornost kao potencijalno važan faktor u razvoju tumora i njihovom odgovoru na terapiju. Tako povećana ekspresija katalaze u stanicama karcinoma dojke dovodi do smanjenog proliferacijskog i migracijskog kapaciteta i izmijenjenog odgovora na kemoterapeutike i zračenje (42).

Peroksidaze su grupa enzima zadužena za redukciju organskih i anorganskih peroksida. Za razliku od SOD i katalaze, peroksidaze nisu ovisne o metalima u aktivnom mjestu enzima, već u aktivnom mjestu ključnu ulogu obnaša cistein. Prema tome, razlikujemo dvije grupe peroksidaza: glutation peroksidaze (koje koriste GSH kao donor elektrona) i tioredoksin peroksidaze (TRX kao donor elektrona). GSH peroksidaze u reakcijama redukcije koriste GSH kao donor elektrona, što dovodi do nastanka oksidiranog glutationa (GSSG), koji se potom reducira u nativni oblik djelovanjem glutation reduktaze koja kao kofaktor koristi NADPH. Tioredoksin peroksidaze reduciraju hidroperoksidge koristeći tioredoksin kao donor elektrona, koji se potom obnavlja djelovanjem, također NADPH-ovisne, tioredoksin reduktaze (41).

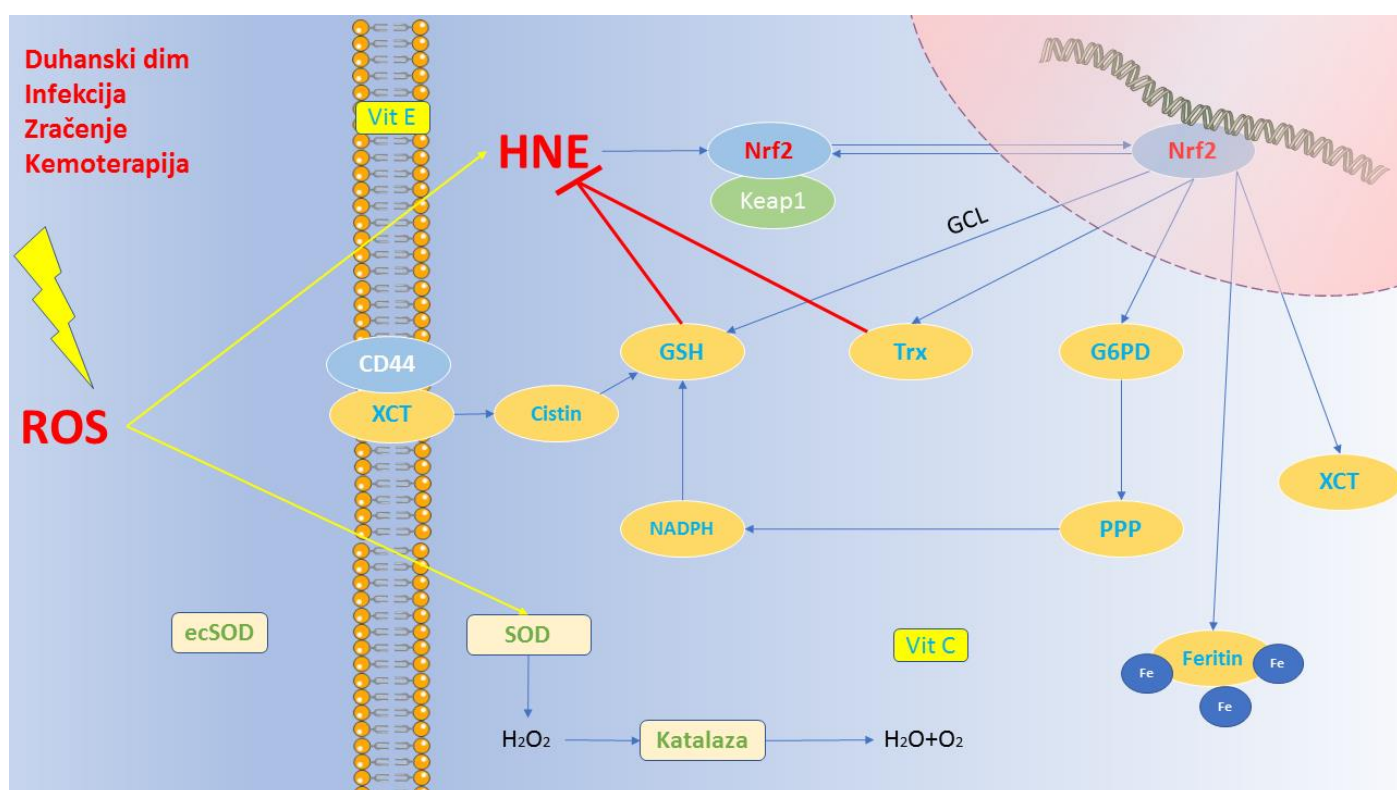
Zajednička osobina nabrojenih antioksidacijskih enzima je NADPH kao reducirajući ekvivalent. NADPH uz to što je kofaktor tioredoksin i glutation reduktazi, također održava i katalazu u aktivnoj formi. Unutarstanični NADPH pretežno nastaje djelovanjem glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD), prvog koraka pentoza fosfatnog puta, te obnaša ključnu ulogu u održavanju puferskog kapaciteta unutarstaničnog glutationa (GSH/GSSG) (11).

Zanimljivo je da Nrf2 kontrolira ekspresiju G6PD čime sudjeluje u preusmjeravanju glukoze u pentoza fosfatni put. Osim G6PD, Nrf2 regulira ekspresiju i preostala 3 stanična enzima putem čijeg djelovanja nastaje NADPH: malični enzim 1 (ME1), 6-fosfoglukonat dehidrogenazu (PGD), izocitrat dehidrogenazu 1 (IDH1). Ovime je dodatno naglašena središnja, regulacijska uloga Nrf2 u odgovoru na oksidacijski stres (43).

Neenzimatski antioksidansi su male hidro- i liposulobilne molekule zaslužne za nespecifičnu zaštitu od slobodnih radikala. Glutation (GSH) je jedan od najvažnijih predstavnika neenzimatskih antioksidansa, iako može sudjelovati i u enzimskoj kaskadi kao kofaktor. Omjer oksidirane i reducirane forme (GSH/GSSG) jedan je od najznačajnijih odrednica oksidacijskog stresa. Kao supstrat za enzime glutacion peroksidazu i transferazu štiti stanice od djelovanja vodikova peroksida, štiti membranu od lipidne peroksidacije i obnaša ključnu ulogu u redukciji vitamina C i E u izvorne oblike.

Vitamin C, odnosno L-askorbinska kiselina, obnaša ulogu unutar- i izvanstaničnog antioksidansa vodene faze primarno odstranjujući ROS. Uz to, esencijalan je za konverziju slobodnih radikala vitamina E u nativnu formu vitamina E.

Vitamin E (α -tokoferol) nalazi se u hidrofobnim unutarnjim područjima stanične membrane i ključan je obrani membrane od oksidacijskih oštećenja. Vitamin E kao donor elektrona peroksilnom radikalu, međuproduktu lipidne peroksidacije, zaustavlja pokrenutu kaskadu reakcija, štiti integritet membrane a time i stanicu od krajnjih produkata lipidne peroksidacije. Alfa-tokoferol je najaktivnija forma vitamina E i glavni membranski antioksidans stanica (41).



Slika 1. Antioksidacijska zaštita stanice i uloga Nrf2.

ecSOD- izvanstanična forma superoksid dismutaze, G6PD- glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, GSH- glutation, HNE- 4-hidroksinonenal, PPP- pentoza fosfatni put, SOD- superoksid dismutaza, Trx- tioredoksin, XCT- cistin-glutamatni transporter

Uloga Nrf2 u karcinogenezi

Uloga Nrf2 u regulaciji staničnog rasta

Učinci Nrf2 nisu ograničeni na izražaj citoprotektivnih enzima koji štite stanicu od oksidacijskih i elektrofilnih podražaja. Postoje dokazi o ulozi Nrf2 u regulaciji drugih transkripcijskih faktora (44) i gena zaduženih za stanični rast i preživljenje (45,46,47). Također je otkriveno da Nrf2 djelomično sudjeluje u regulaciji proliferacije stanica od strane EGFR-MEK1/2-ERK osi (48).

Nedavna je studija pokazala da Nrf2, zajedno s PI3K/Akt signalnim putem sudjeluje u preusmjeravanju metabolizma u pentoza fosfatni put i skretanju metabolita glukoze u puteve *de novo* sinteze nukleotida (49). Nrf2 također inducira sintezu GSH i NADPH (49) i regulira gene zadužene za metabolizam lipida (50,51). Povećana dostupnost metabolita potiče proliferaciju stanica i sigurno je dio lepeze mehanizama kojima Nrf2 inducira rast tumora. Važno je napomenuti da indukcija metaboličkih gena od strane Nrf2 mora zadovoljiti 2 osnovna preduvjeta: PI3K/Akt signalni put mora biti aktivan i sam Nrf2 se mora akumulirati u količinama većim od onih potrebnih za transkripciju antioksidacijskih enzima (49). Potonje objašnjava ograničenost onkogenih učinaka transkripcijskog faktora na stanice koje su već prethodno krenule putem maligne transformacije.

Vrijedno je spomenuti i zanimljivu interakciju s E-kadherinom, ključnim adhezijskim proteinom u ljudskim tkivima (52), koji obnaša dužnost korepresora Nrf2 u prisutnosti β -katenina te veže Nrf2 u blizini stanične membrane i time sprječava njegovu translokaciju u jezgru. Također, povećana rezistencija na doksorubicin je zamjećena u staničnim linijama hepatocelularnog karcinoma s niskom ekspresijom E-kadherina (53). Spomenuto je zanimljivo zbog činjenice da je smanjena ekspresija E-kaadherina uobičajen nalaz tokom progresije tumora i korelira s povećanim invazivnim potencijalom stanica (54).

Nrf2 i regulacija apoptoze

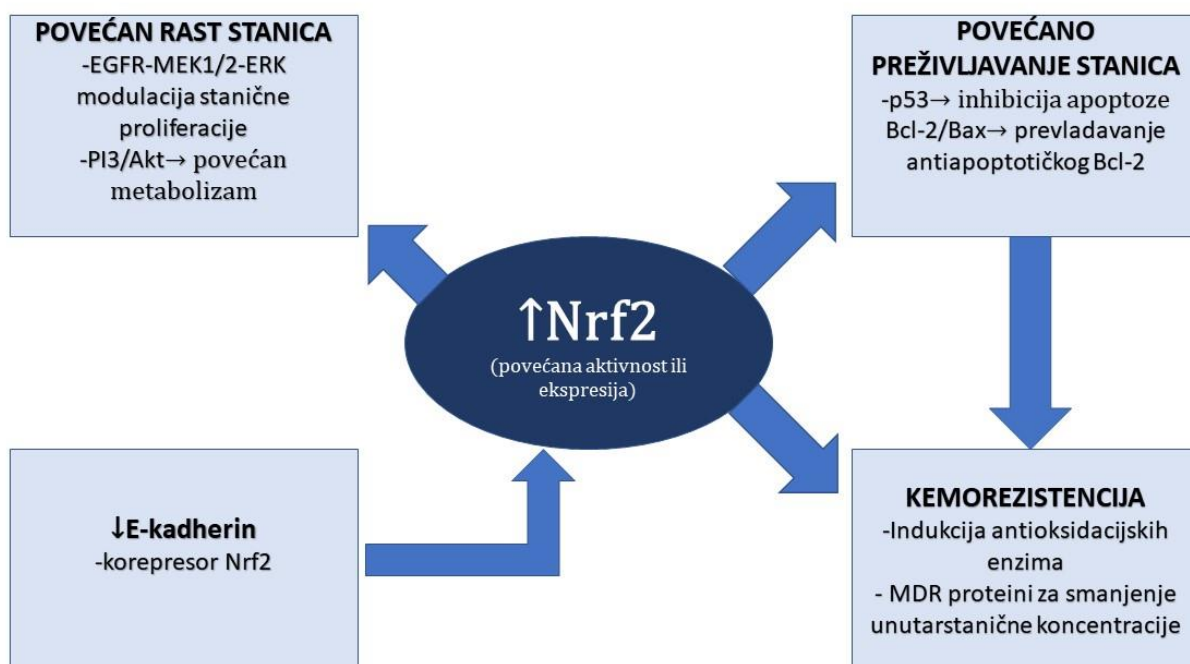
Uz povećanje proliferacijskog potencijala, ključan korak u karcinogenezi je izbjegavanje staničnih tumor-supresorskih mehanizama. Nefunkcionalni i slabo regulirani apoptotički putevi su jedna od glavnih značajki stanica karcinoma. Veze i međudjelovanja Nrf2 i nekih efektoru apoptoze su zamijećene u više studija.

Tumor supresor p53, koji pokreće apoptozu po nepopravljivom oštećenju DNA, inhibira transkripcijsku aktivnost Nrf2 u više staničnih linija (55). Inicijalna je pretpostavka bila da p53 navedeni učinak ostvaruje direktnim vezanjem na ARE. Daljnjim istraživanjem je dokazano da se inhibicija ne ostvaruje vezanjem na ARE, već da je direktni inhibitor protein p21 (56). Slično je primjećeno prilikom transfekcije više staničnih linija „hiperaktivnim“ mutantima p53^{R273H} i p53^{248Q} gdje je staničnoj smrti prethodila smanjena indukcija ekspresije enzima koji sudjeluju u drugoj fazi detoksikacije lijekova (57). Sve navedeno sugerira kako je inhibicija Nrf2 esencijalan korak u apoptozi

koju pokreće p53. Tako bi povećana ekspresija Nrf2 i njegovih transkripata mogla interferirati te konačnici zaustaviti apoptozu koju p53 pokreće prilikom oštećenja DNA i doprinijeti karcinogenezi.

Sljedeća važna spona između aktivnosti Nrf2 puta i pro- i antiapoptotičkih puteva je regulacija proteina iz Bcl-2 obitelji (58,59,60). Keap1 direktno vezuje Bcl-2 i potiče ubikvitinaciju ovog antiapoptotičkog proteina Cul3-ubikvintin- E3 ligaznim sustavom te izaziva posljedičnu razgradnju u proteasomima (58). Keap1 se pritom veže na BH2 domenu Bcl-2, istu onu kojom potonji stvara vezu s proapoptotičkim proteinom Bax (61). Tako se Keap1 natječe s Bax-om za vezno mjesto na Bcl-2, dovodi do povećanog obrtaja Bcl-2, stabilizacije Bax-a i posljedično potiče apoptozu. Suprotno, u slučaju smanjene razine Keap1 ili mutacija koje dovode do promjena u aktivnom mjestu proteina, razina unutarstaničnih antiapoptotičkih signala posredovanih Bcl-2 raste. Potonje barem dijelom može objasniti terapijsku rezistenciju tumora sa smanjenom razinom Keap1 (62)

Nedavno je također dokazano da Nrf2 može direktno aktivirati transkripciju antiapoptotičkih proteina Bcl-2 i Bcl-XL te doprinijeti preživljenju stanica i otpornosti na terapiju (60,63).



Slika 2. Nrf2 kao protoonkogen

Mutacije Nrf2 i Keap1 u karcinomu pluća nemalih stanica

Prva mutacija u Nrf2 signalnom putu je primijećena 2006 godine. Radilo se o dvije točkaste mutacije koje su zahvatile Kelch-nalik ponavljajuću domenu Nrf2 (64), ujedno i domenu kojom Keap1 vezuje Nrf2. Navedeni je rad dokazao da su i točkaste mutacije dovoljne da se značano omete vezanje i ubikvitinacija Nrf2 te posljedično povisi njegova razina u stanicama. U godinama nakon toga, samo u karcinomima pluća je identificirano preko 50 različitih mutacija Nrf2/Keap1 (18).

U karcinomu pluća, Nrf2 put je detaljnije proučavan u karcinomu pluća nemalih stanica, učestalijem tipu, te formi koju karakterizira veća neosjetljivost na terapiju nego što je slučaj s karcinomom pluća malih stanica. Primijećene su mutacije u genu za Keap1 u 25% pacijenata i gubitak heterozigotnosti (LOS od eng. Loss of heterozygosity) (65). Slični su rezultati uočeni i u proučavanim staničnim linijama u tom istraživanju kao i među raznim skupinama pacijenata u istraživanjima koja su uslijedila (66,67,68).

Mutacije kodirajuće regije Nrf2 također su prvo opisane u karcinomu pluća i dominantno se radi o mutacijama Keap1-vežuće domene Neh2, koja se sastoji od ETGE i DLG motiva (69). Mutacije ETGE motiva su imale veći utjecaj na aktivnost Nrf2 od mutacija DLG motiva, jer je funkcionalan ETGE motiv dostatan za vezanje s Keap1. Iz ove studije vrijedi izdvojiti da mutacije Keap1 i Nrf2 ni u jednom uzorku nisu bile udružene, što indicira da su ove abnormalnosti dovoljno snažne da se međusobno isključuju.

Obilježja pacijenata s mutacijama Nrf2 su veća incidencija pušenja i karcinoma pločastih stanica, manja incidencija EGFR mutacija te lošija prognoza.

Epigenetske modifikacije ekspresije i posttranskripcijska regulacija

Iako se ne radi o mutacijama, značaj promijenjenog obrasca metilacije možda i nadmašuje klasične mutacije kodirajućih regija Nrf2 i Keap1.

Aberantna hipermetilacija CpG otoka je primijećena u promotorskoj regiji Keap1 gena u istraživanju na staničnim linijama i manjem broju humanih uzoraka (70). Tretman tih staničnih linija s hipometilirajućim agensom 5'-azacitidinom je uzrokovao povećanje ekspresije Keap1. Kasnije je na nešto većem broju pacijenata, točnije 47, potvrđen ovaj nalaz. Također je potvrđeno da je aberantna hipermetilacija promotorske regije Keap1 učestalija od mutacija gena i gubitka heterozigotnosti (47% naprama 15% i 21%) (71).

Histon acetil-transferaze (HAT) su enzimi koji su primarno epigenetski transkripcijski koaktivatori, ali također u određenim uvjetima acetiliraju i ne-histonske proteine. HAT kao p300 i CBP acetiliraju Nrf2 u njegovim C-terminalnim domenama Neh1 i Neh3. U oba slučaja acetilacija Nrf2 proteina rezultira aktivacijom transkripcije, ali čini se da p300 svoje učinke ostvaruje u staničnoj jezgri dok CBP

acetilira Nrf2 u citoplazmi što uzrokuje njegovu translokaciju u jezgru i transkripcijsku aktivnost (72,73).

Nrf2 i autofagija

Poremećaj autofagije je dodatni faktor koji može utjecati na povećanu aktivnost Nrf2 u stanicama raka. Kao posljedica poremećaja autofagije dolazi do nakupljanja proteina p62, poliubikvitin vežućeg proteina koji detektira supstrate za proces autofagije. STGE motiv p62 stupa u sličnu interakciju s DC proteinskim džepovima Keap1 sa jednakim afinitetom kao i DLG motiv Nrf2 (18). Poremećaj autofagije uzrokuje nakupljanje p62 u stanici u obliku inkluzijskih tjelešaca. Nakupljeni p62 dovodi do kompeticije između p62 i Nrf2 te do posljedičnog oslobađanja Nrf2, njegove stabilizacije i translokacije u jezgru.

Utjecaj nakupljanja p62 na prognozu bolesti je ispitan u dvije studije koje su zajedno brojile preko 500 pacijenata, te je količina citoplazmatskog p62 negativno korelirala s ishodom i odgovorom na terapiju (74,75).

Utjecaj izražaja Nrf2 i Keap1 na prognozu karcinoma pluća nemalih stanica

Istraživanjem funkcija Nrf2 nametnulo se pitanje o utjecaju promjena ekspresije Nrf2, mutacija i epigenetskih promjena na prognozu kao i odgovor na terapiju. Ukoliko nije drugačije navedeno, studije su proučavale pacijente koji su uz kirurški zahvat podvrgnuti adjuvantnoj kemoterapiji baziranoj na platini.

U karcinomu pluća nemalih stanica detektirano je preko 50 polimorfizama jednog nukleotida kodirajućih regija Nrf2 i Keap1 (65). Istovremeno, udio pacijenata s takvim mutacijama varira među studijama od 10 do 25% (65,66,67,68,76). Mutacije Nrf2 potvrđene su kao legitiman prognostički marker u karcinomima pluća, glave i vrata (47), dok su mutacije Keap1 predložene kao marker loše prognoze, povećanog rizika za metastaze, ponovnu pojavu bolesti te rezistenciju na kemoterapiju (77). Dodatno je uz 14 najčešćih mutacija kodirajuće regije Nrf2 uočena povišena ekspresija MRP3 gena (78), zaslužnog za rezistenciju na brojne kemoterapeutike (79). Preživljenje pacijenata s mutacijama Nrf2 i povećanom ekspresijom Nrf2 je bilo značajno lošije u odnosu na kontrole.

Važno je napomenuti da je zbog različitog obrasca i tipova mutacija među studijama provedenim u Aziji (66,68) i onima provedenim u Sjedinjenim Američkim Državama (66), nužan oprez pri interpretaciji rezultata.

Također, Okano i al. dokazala su da homozigoti za jedan od najčešćih polimorfizama, 617 A/A, imaju smanjeni učinak pozitivne povratne sprege u transkripciji Nrf2 i gena ARE kasete u usporedbi s heterozigotima, 617 C>A. Spomenuta grupa homozigota je pokazala značajno bolje preživljenje tokom 1700 dana poslije operacijskog zahvata (80,81).

Epigenetske promjene promotora Keap1 velikim dijelom doprinose lošijem odgovoru na kemoterapiju i progresiji bolesti. Dok učestalost mutacija i gubitka heterozigotnosti varira između 15 i 20%, u skoro polovici (47%) tumora zamijećena je aberantna hipermetilacija promotorske regije (71). Coxovom regresijom demonstrirano je da kombinacija mutacije i aberantne hipermetilacije, pronađena u 26% pacijenata, nosi posebice lošu prognozu (71).

Dodatno, pretjerani izražaj histon acetil transferaza hMOF uočen je u tkivu NSCLC u usporedbi s priležnim normalnim tkivom pluća ($p=0.0001$) u kohorti od 54 pacijenta. Dotični enzim stupa u fizičku interakciju s transkripcijskim faktorom Nrf2, acetilira ga, te tako dovodi do njegove retencije u jezgri i povećane transkripcijske aktivnosti. Acetilacija se odvija kao odgovor na oksidacijski podražaj (hidrogen peroksid) i kemoterapeutike. U skupini s visokom razinom hMOF ukupno i preživljenje bez bolesti bilo je značajno lošije nego u skupini pacijenata s ekspresijom hMOF (82).

Brojne su studije rađene kako bi se dokazala povezanost signala imunohistokemije tkiva karcinoma na Nrf2 i kliničke i patološke slike (83,84,85,86). Sve su studije pokazale negativnu korelaciju između Nrf2 i ukupnog preživljenja te preživljenja bez bolesti tj. lošiji odgovor na kombinaciju kirurškog liječenja i adjuvantne kemoterapije režimima baziranim na platini. Dodatno, jedna je studija pokazala pozitivnu korelaciju između izražaja Nrf2 i metastaza u limfnim čvorovima i negativnu korelaciju s diferencijacijom tumora (83).

Kako povećana ekspresija transkripcijskog faktora na imunohistokemiji ne znači ujedno i povećanu transkripcijsku aktivnost, javlja se potreba za pronalaskom dodatnog markera koji bi odražavao transkripcijsku aktivnost Nrf2. Mjerenje broja kopija mRNA Nrf2 zasigurno precizno odražava transkripcijsku aktivnost Nrf2 i jačinu pozitivne povratne sprege (87), ali kompleksnost i cijena RT-PCR zasigurno ograničavaju implementaciju analize u rutinsku kliničku praksu.

Alternativni pristup se bazira na detekciji dodatnog produkta transkripcije koji bi odražavao aktivnost Nrf2. Broj gena koji imaju antioksidacijski element odgovora u promotoru i koje transkribira Nrf2 je pozamašan (tablica 1) te se zasad ne nalazi pouzdan marker transkripcijske aktivnosti Nrf2. Jedna je skupina tome pokušala doskočiti promatranjem izražaja NQO1 (NAD(P)H kinon oksidoreduktaze 1), transkripta Nrf2 (tablica 1). Međutim, pozitivan izražaj i NQO1 i Nrf2 nije bio bolji prognostički pokazatelj od samog Nrf2. Tek je dvostruka negativna ekspresija Nrf2 i NQO1 predviđala odlične ishode za pacijente (83). Druga je studija zajedno s izražajem Nrf2 na imunohistokemiji promatrala izražaj njegova stabilizatora DJ1 (od eng. nuclear factor erythroid derived 2-like 2) (85).

Na koncu, Qian i al. su predložili testiranje ekspresije 35 s Nrf2 povezanih gena metodom TMA (od eng. tissue microarray) te formiranje posebne ocjenske ljestvice NAMS. Spomenuta je ljestvica pokazala statistički najveću značajnost u predviđanju ishoda, odnosno, ukupnog preživljenja i preživljenja bez bolesti u usporedbi s drugim kliničkim i genetskim pokazateljima u studiji (88).

Nrf2 kao meta terapije NSCLC

Istraživanja *in vitro* i *in vivo* pružaju dovoljno dokaza da se Nrf2 smatra atraktivnom terapijskom metom u karcinomu pluća nemalih stanica. Kao što je prije spomenuto, prepoznata je dvojna uloga Nrf2 u karcinogenezi; u ranom stadiju djeluje protektivno aktivacijom citoprotektivnih gena te poticanjem eliminacije i metabolizma ROS, HNE i ksenobiotika iz stanice, a u kasnijim stadijima bolesti njegovo djelovanje omogućava preživljenje stanicama raka povećanjem rezistencije na konvencionalnu kemo- i radioterapiju.

Efikasna inhibicija Nrf2 favorizirala bi zastoj u rastu i učinila stanice osjetljivijima na apoptozu (65), te u teoriji djeluje obećavajuće u kombinaciji s trenutnim terapijskim režimima. Također, zaštita stanica karcinoma od strane Nrf2 nije ograničena na kemoterapeutike koji svoj efekt ostvaruju stvaranjem ROS i HNE, tako da bi se učinkovitost mnogih kemoterapijskih režima mogla povećati u kombinaciji s agensima koji djeluju inhibitorno na Nrf2 (89). Važno je spomenuti kako je *knockdown* Nrf2 u seroznom karcinomu endometrija, inače izuzetno rezistentnom na terapiju, senzitivizirao na kemoterapiju samo stanice s visokim bazalnim razinama aktivnosti Nrf2 (90). Potonje sugerira kako bi režim baziran na inhibiciji Nrf2 bio siguran za normalne stanice.

Provedena su istraživanja kako bi se ispitala učinkovitost apigenina (prirodnog bioflavonoida koji se nalazi u sastavu mnogih vrsta voća i povrća) u inhibiciji Nrf2 puta. Apigenin je, kao posljedicu smanjene aktivnosti PI3/Akt signalnog puta, inhibirao Nrf2 i na razini transkripcije i translacije. Također, apigenin je senzitivizirao doksorubicin rezistentnu staničnu liniju hepatocelularnog karcinoma BEL-7402 na terapiju doksorubicinom. Uz to, doksorubicin u kombinaciji s apigeninom bio je uspješniji od samog doksorubicina u terapiji BEL-7402 ksenograftova (91,92).

Sve trans retinoična kiselina- ATRA (od eng. all trans-retinoic acid) je sljedeći predloženi inhibitor Nrf2. Svoj učinak ostvaruje poticanjem formiranja kompleksa Nrf2 i RAR α (od eng. retinoic acid receptor alpha). Ti se kompleksi ne vežu na ARE sekvence te je posljedično blokirana transkripcija putem Nrf2 (92,93,94).

Malabrikon-A (MAL-A) je prooksidacijski spoj vjerojatno veće aktivnosti u leukemijama nego u solidnim tumorima. Svoje djelovanje ostvaruje snižavanjem razine Nrf2 u stanici i povećanjem disbalansa u redoks statusu stanica (95). MAL-A inducira peroksidaciju kardiolipina, a biološki najaktivniji produkt je HNE. Kako je HNE prepoznat kao drugi glasnik oksidacijskog stresa i u

visokim koncentracijama inducira apoptozu u stanicama, možemo pretpostaviti kako je HNE zajedno sa sniženom razinom Nrf2 zaslužan za opisanu kemosenzibilizaciju (92). Potvrdu ove pretpostavke možemo tražiti u rezultatima nedavne *in vitro* i kliničke studije koja je dokazala postupno sniženje koncentracije kardiolipina u uzorcima tkiva hepatocelularnog karcinoma u usporedbi s normalnim tkivom. Posljedično tome, smanjena je oksidacija kardiolipina i smanjen je nastanak HNE-a. Ovo bi mogla biti jedna od prilagodbi stanica raka kojom izbjegavaju apoptozu (96).

Leinonen i al. su razvili zanimljiv pristup problematici i upotrijebili terapijsku strategiju znanu kao suicidalna genska terapija. Upotrebom lentivirusnog vektora, timidin kinaze herpes simpleks virusa, koji sadržava ARE sekvencu u promotoru (ARE-HSV-TK), upotrijebili su konstitutivno visoku ekspresiju Nrf2 protiv samih stanica. Spomenuti je pristup testiran na adenokarcinomu pluća te su rezultati obećavajući i *in vitro* i *in vivo* (97).

Zaključno, zasad još postoji nekoliko prepreka za efikasnu inhibiciju Nrf2 koja bi sinergistički djelovala s konvencionalnom kemo- i radioterapijom. Supstance koje inhibiraju Nrf2 su većinom neselektivni elektrofilni čije potencijalno vezanje na cistein u drugim proteinima nosi veliki rizik od nespecifičnih toksičnih učinaka na drugim proteinima kao npr. enzimima (89,94). Također, Nrf2 možda ima i druge uloge dijametralno suprotne od citoprotekcije. Ovo treba biti u potpunosti ispitano prije implementacije inhibitorne kemoterapije. Primjećeno je da Nrf2 sudjeluje u diferencijaciji stanica akutne mijeloične leukemije inducirane vitaminom D (98) i da Keap1 inhibira o PPAR γ ovisnu diferencijaciju (99). Time bi inhibicija Nrf2 mogla poništiti pozitivne učinke agensa koji izazivaju diferencijaciju malignih stanica (89).

Zaključak

Nrf2 je zasigurno zanimljiva dijagnostička i terapijska meta u karcinomu pluća nemalih stanica. Prilikom dijagnostike pruža nam mogućnost da prepoznamo pacijente kojima bi mogao koristiti alternativni pristup u terapiji. Neovisno o razvoju specifičnih inhibitora Nrf2, upravo potencijal da se imunohistokemijskom analizom tkiva prepoznaju pacijenti s lošijom prognozom i lošijim odgovorom na terapiju pruža mogućnost personalizacije i optimizacije terapije za pojedinog pacijenta. Prije implementacije Nrf2 u rutinsku patohistološku analizu potrebno je daljnjim studijama odrediti pouzdanost i negativnu prediktivnu vrijednost samog Nrf2 te možda inkorporirati dodatni marker koji bi odražavao transkripcijsku aktivnost Nrf2 u rutinsku analizu.

Također, razvoj strategija koje će eksploatirati konstitutivno povišene razine Nrf2 u stanicama doima se kao zanimljiva alternativa konvencionalnim terapijskim režimima. Takav pristup bi nam mogao omogućiti da prilagodljivog protivnika kao što je karcinom pobijedimo iskorištavanjem njegovih oružja.

Zahvale

Mojim roditeljima hvala na vjeri u mene, podršci, ljubavi i usađenoj radnoj etici. Hvala Tei, lektorici ovog rada, koja je puno više od toga.

Zahvaljujem se mentoru prof.dr.sc. Nikoli Đakoviću na pristupačnosti, dostupnosti, ljubaznosti i podršci. Dr.sc. Ani Čipak Gašparović najljepše hvala na prilici da zavolim znanost.

Literatura

1. Šekerija Mario, Bubanović L, Novak P, Šelendić Đ, Lončar J, Čukelj P. Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2014. 2014;(39):1-44
2. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2015
3. Sakashita, S., Sakashita, M., & Sound Tsao, M. (2014). Genes and Pathology of Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Seminars in Oncology*, 41(1), 28–39.
<https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2013.12.008>
4. Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., ... WHO Panel. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(9), 1243–1260.
<https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630>
5. Chen, Z., Fillmore, C. M., Hammerman, P. S., Kim, C. F., & Wong, K.-K. (2014). Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nature Reviews Cancer*, 14(8), 535–546.
<https://doi.org/10.1038/nrc3775>
6. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology™. Non-small cell lung cancer. V2.2009. Available at: www.nccn.org; 2009 [accessed May 26].
7. Chang, A. (2011). Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. *Lung Cancer*, 71(1), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.08.022>
8. Group, N.-S. C. L. C. C. (1995). Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 311(7010), 899–909.
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7580546>
9. PORT Meta-analysis Trialists Group. (2005). Postoperative radiotherapy for non-small cell lung cancer. In L. Rydzewska (Ed.), *Cochrane Database of Systematic Reviews* (p.

- CD002142). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD002142.pub2>
10. Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364–78.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>
 11. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov*. Nature Publishing Group; 2013;12(12):931–47.
<https://doi.org/10.1038/nrd4002>
 12. Jones, R. G., & Thompson, C. B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes & Development*, 23(5), 537–548. <https://doi.org/10.1101/gad.1756509>
 13. Shi, X., Zhang, Y., Zheng, J., & Pan, J. (2012). Reactive Oxygen Species in Cancer Stem Cells. *Antioxidants & Redox Signaling*, 16(11), 1215–1228. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4529>
 14. Kim, H. M., Haraguchi, N., Ishii, H., Ohkuma, M., Okano, M., Mimori, K., ... Mori, M. (2012). Increased CD13 Expression Reduces Reactive Oxygen Species, Promoting Survival of Liver Cancer Stem Cells via an Epithelial–Mesenchymal Transition-like Phenomenon. *Annals of Surgical Oncology*, 19(S3), 539–548. <https://doi.org/10.1245/s10434-011-2040-5>
 15. Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak a, Eckl PM, Huc L, et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res*. 2010;44(10):1098–124.
<https://doi.org/10.3109/10715762.2010.498477>
 16. Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res*. 2003 Jul;42(4):318–43.
 17. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S, Ayala A, Munoz MF, Arguelles S, et al. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014(May 2014):1–31.
<https://doi.org/10.1155/2014/360438>
 18. Huang Y, Li W, Kong A-NT. Anti-oxidative stress regulator NF-E2-related factor 2 mediates the adaptive induction of antioxidant and detoxifying enzymes by lipid peroxidation metabolite 4-hydroxynonenal. *Cell Biosci* <https://dx.doi.org/10.1186%2F2045-3701-2-40>
 19. Ishii, T., Itoh, K., Ruiz, E., Leake, D. S., Unoki, H., Yamamoto, M., & Mann, G. E. (2004). Role of Nrf2 in the Regulation of CD36 and Stress Protein Expression in Murine Macrophages: Activation by Oxidatively Modified LDL and 4-Hydroxynonenal. *Circulation Research*, 94(5), 609–616. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000119171.44657.45>
 20. Zhang, Y., Sano, M., Shinmura, K., Tamaki, K., Katsumata, Y., Matsushashi, T., ... Fukuda, K. (2010). 4-hydroxy-2-nonenal protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via the Nrf2-dependent pathway. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 49(4), 576–86.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.05.011>

21. Siow, R. C. M., Ishii, T., & Mann, G. E. (2007). Modulation of antioxidant gene expression by 4-hydroxynonenal: atheroprotective role of the Nrf2/ARE transcription pathway. *Redox Report*, 12(1–2), 11–15. <https://doi.org/10.1179/135100007X162167>
22. Tanito, M., Agbaga, M.-P., & Anderson, R. E. (2007). Upregulation of thioredoxin system via Nrf2-antioxidant responsive element pathway in adaptive-retinal neuroprotection in vivo and in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(12), 1838–1850. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.018>
23. Ishii, T., Itoh, K., Ruiz, E., Leake, D. S., Unoki, H., Yamamoto, M., & Mann, G. E. (2004). Role of Nrf2 in the Regulation of CD36 and Stress Protein Expression in Murine Macrophages: Activation by Oxidatively Modified LDL and 4-Hydroxynonenal. *Circulation Research*, 94(5), 609–616. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000119171.44657.45>
24. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonenn AL. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* Elsevier; 2013;1(1):45–9.
25. Sporn, M. B., & Liby, K. T. (2012). NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nature Reviews Cancer*, 12(8), 564–571. <https://doi.org/10.1038/nrc3278>
26. Taguchi, K., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2011). Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells*, 16(2), 123–140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x>
27. Sporn, M. B., & Liby, K. T. (2012). NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nature Reviews Cancer*, 12(8), 564–571. <https://doi.org/10.1038/nrc3278>
28. DeNicola, G. M., Karreth, F. A., Humpton, T. J., Gopinathan, A., Wei, C., Frese, K., ... Tuveson, D. A. (2011). Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature*, 475(7354), 106–109. <https://doi.org/10.1038/nature10189>
29. Hanada, N., Takahata, T., Zhou, Q., Ye, X., Sun, R., Itoh, J., ... Saijo, Y. (2012). Methylation of the KEAP1 gene promoter region in human colorectal cancer. *BMC Cancer*, 12(1), 66. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-66>
30. Zhang, P., Singh, A., Yegnasubramanian, S., Esopi, D., Kombairaju, P., Bodas, M., ... Biswal, S. (2010). Loss of Kelch-Like ECH-Associated Protein 1 Function in Prostate Cancer Cells Causes Chemoresistance and Radioresistance and Promotes Tumor Growth. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(2), 336–346. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0589>
31. Adam, J., Hatipoglu, E., O’Flaherty, L., Ternette, N., Sahgal, N., Lockstone, H., ... Pollard, P. J. (2011). Renal Cyst Formation in Fh1-Deficient Mice Is Independent of the Hif/Phd Pathway: Roles for Fumarate in KEAP1 Succination and Nrf2 Signaling. *Cancer Cell*, 20(4), 524–537. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.09.006>
32. Ooi, A., Wong, J.-C., Petillo, D., Roossien, D., Perrier-Trudova, V., Whitten, D., ... Furge, K. A. (2011). An Antioxidant Response Phenotype Shared between Hereditary and Sporadic Type

- 2 Papillary Renal Cell Carcinoma. *Cancer Cell*, 20(4), 511–523.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.08.024>
33. Ma, Q., & He, X. (2012). Molecular Basis of Electrophilic and Oxidative Defense: Promises and Perils of Nrf2. *Pharmacological Reviews*, 64(4), 1055–1081.
<https://doi.org/10.1124/pr.110.004333>
34. MacLeod, A. K., McMahon, M., Plummer, S. M., Higgins, L. G., Penning, T. M., Igarashi, K., & Hayes, J. D. (2009). Characterization of the cancer chemopreventive NRF2-dependent gene battery in human keratinocytes: demonstration that the KEAP1–NRF2 pathway, and not the BACH1–NRF2 pathway, controls cytoprotection against electrophiles as well as redox-cycling compounds. *Carcinogenesis*, 30(9), 1571–1580. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp176>
35. Agyeman, A. S., Chaerkady, R., Shaw, P. G., Davidson, N. E., Visvanathan, K., Pandey, A., & Kensler, T. W. (2012). Transcriptomic and proteomic profiling of KEAP1 disrupted and sulforaphane-treated human breast epithelial cells reveals common expression profiles. *Breast Cancer Research and Treatment*, 132(1), 175–187. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1536-9>
36. Hirotsu, Y., Katsuoka, F., Funayama, R., Nagashima, T., Nishida, Y., Nakayama, K., ... Yamamoto, M. (2012). Nrf2–MafG heterodimers contribute globally to antioxidant and metabolic networks. *Nucleic Acids Research*, 40(20), 10228–10239.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks827>
37. Malhotra, D., Portales-Casamar, E., Singh, A., Srivastava, S., Arenillas, D., Happel, C., ... Biswal, S. (2010). Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Research*, 38(17), 5718–5734. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq212>
38. Chorley, B. N., Campbell, M. R., Wang, X., Karaca, M., Sambandan, D., Bangura, F., ... Bell, D. A. (2012). Identification of novel NRF2-regulated genes by ChIP-Seq: influence on retinoid X receptor alpha. *Nucleic Acids Research*, 40(15), 7416–29.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks409>
39. Yates, M. S., Tran, Q. T., Dolan, P. M., Osburn, W. O., Shin, S., McCulloch, C. C., ... Kensler, T. W. (2009). Genetic versus chemoprotective activation of Nrf2 signaling: overlapping yet distinct gene expression profiles between Keap1 knockout and triterpenoid-treated mice. *Carcinogenesis*, 30(6), 1024–31. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp100>
40. Birben E, Murat U, Md S, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO J*. 2012;5(January):9–19.
41. Gašparović AČ, Lovaković T, Žarković N. Oxidative stress and antioxidants: Biological response modifiers of oxidative homeostasis in cancer. *Period Biol*. 2010;112(4):433–9
42. Glorieux C, Dejeans N, Sid B, Beck R, Calderon PB, Verrax J. Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. *Biochem Pharmacol*. 2011;82(10):1384–90.

43. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci.* Elsevier Ltd; 2014;39(4):199–218.
44. Wu, K. C., Cui, J. Y., Klaassen, C. D., Klaassen, C., & Kimura, K. (2012). Effect of Graded Nrf2 Activation on Phase-I and -II Drug Metabolizing Enzymes and Transporters in Mouse Liver. *PLoS ONE*, 7(7), e39006. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039006>
45. Reddy, N. M., Kleeberger, S. R., Yamamoto, M., Kensler, T. W., Scollick, C., Biswal, S., & Reddy, S. P. (2007). Genetic dissection of the Nrf2-dependent redox signaling-regulated transcriptional programs of cell proliferation and cytoprotection. *Physiological Genomics*, 32(1), 74–81. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00126.2007>
46. Malhotra, D., Portales-Casamar, E., Singh, A., Srivastava, S., Arenillas, D., Happel, C., ... Biswal, S. (2010). Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Research*, 38(17), 5718–5734. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq212>
47. Shibata, T., Saito, S., Kokubu, A., Suzuki, T., Yamamoto, M., & Hirohashi, S. (2010). Global Downstream Pathway Analysis Reveals a Dependence of Oncogenic NF-E2-Related Factor 2 Mutation on the mTOR Growth Signaling Pathway. *Cancer Research*, 70(22), 9095–9105. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0384>
48. Yamadori, T., Ishii, Y., Homma, S., Morishima, Y., Kurishima, K., Itoh, K., ... Hizawa, N. (2012). Molecular mechanisms for the regulation of Nrf2-mediated cell proliferation in non-small-cell lung cancers. *Oncogene*, 31(45), 4768–4777. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.628>
49. Mitsuishi, Y., Taguchi, K., Kawatani, Y., Shibata, T., Nukiwa, T., Aburatani, H., ... Motohashi, H. (2012). Nrf2 Redirects Glucose and Glutamine into Anabolic Pathways in Metabolic Reprogramming. *Cancer Cell*, 22(1), 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.05.016>
50. Yates, M. S., Tran, Q. T., Dolan, P. M., Osburn, W. O., Shin, S., McCulloch, C. C., ... Kensler, T. W. (2009). Genetic versus chemoprotective activation of Nrf2 signaling: overlapping yet distinct gene expression profiles between Keap1 knockout and triterpenoid-treated mice. *Carcinogenesis*, 30(6), 1024–1031. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp100>
51. Kitteringham, N. R., Abdullah, A., Walsh, J., Randle, L., Jenkins, R. E., Sison, R., ... Park, B. K. (2010). Proteomic analysis of Nrf2 deficient transgenic mice reveals cellular defence and lipid metabolism as primary Nrf2-dependent pathways in the liver. *Journal of Proteomics*, 73(8), 1612–1631. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.03.018>
52. Angst, B. D., Marcozzi, C., & Magee, A. I. (2001). The cadherin superfamily: diversity in form and function. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 4), 629–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171368>

53. Kim, W. D., Kim, Y. W., Cho, I. J., Lee, C. H., & Kim, S. G. (2012). E-cadherin inhibits nuclear accumulation of Nrf2: implications for chemoresistance of cancer cells. *Journal of Cell Science*, 125(5), 1284–1295. <https://doi.org/10.1242/jcs.095422>
54. Tian, X., Liu, Z., Niu, B., Zhang, J., Tan, T. K., Lee, S. R., ... Zheng, G. (2011). E-cadherin/ β -catenin complex and the epithelial barrier. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011, 567305. <https://doi.org/10.1155/2011/567305>
55. Faraonio, R., Vergara, P., Di Marzo, D., Pierantoni, M. G., Napolitano, M., Russo, T., & Cimino, F. (2006). p53 Suppresses the Nrf2-dependent Transcription of Antioxidant Response Genes. *Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 39776–39784. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605707200>
56. el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., ... Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75(4), 817–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8242752>
57. Kalo, E., Kogan-Sakin, I., Solomon, H., Bar-Nathan, E., Shay, M., Shetzer, Y., ... Rotter, V. (2012). Mutant p53 R273H attenuates the expression of phase 2 detoxifying enzymes and promotes the survival of cells with high levels of reactive oxygen species. *Journal of Cell Science*, 125(22), 5578–5586. <https://doi.org/10.1242/jcs.106815>
58. Niture, S. K., & Jaiswal, A. K. (2011). INrf2 (Keap1) targets Bcl-2 degradation and controls cellular apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 18(3), 439–451. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.114>
59. Chen, Q., Li, W., Wan, Y., Xia, X., Wu, Q., Chen, Y., ... Li, W. (2012). Amplified in breast cancer 1 enhances human cholangiocarcinoma growth and chemoresistance by simultaneous activation of Akt and Nrf2 pathways. *Hepatology*, 55(6), 1820–1829. <https://doi.org/10.1002/hep.25549>
60. Niture, S. K., & Jaiswal, A. K. (2012). Nrf2 Protein Up-regulates Antiapoptotic Protein Bcl-2 and Prevents Cellular Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 287(13), 9873–9886. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.312694>
61. Yin, X.-M., Oltvai, Z. N., & Korsmeyer, S. J. (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, 369(6478), 321–323. <https://doi.org/10.1038/369321a0>
62. Tung, M.-C., Lin, P.-L., Wang, Y.-C., He, T.-Y., Lee, M.-C., Yeh, S. D., ... Lee, H. (2015). Mutant p53 confers chemoresistance in non-small cell lung cancer by upregulating Nrf2. *Oncotarget*, 6(39), 41692–705. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6150>
63. Niture, S. K., & Jaiswal, A. K. (2013). Nrf2-induced antiapoptotic Bcl-xL protein enhances cell survival and drug resistance. *Free Radical Biology and Medicine*, 57, 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.014>

64. Padmanabhan, B., Tong, K. I., Ohta, T., Nakamura, Y., Scharlock, M., Ohtsuji, M., ... Yamamoto, M. (2006). Structural Basis for Defects of Keap1 Activity Provoked by Its Point Mutations in Lung Cancer. *Molecular Cell*, 21(5), 689–700.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.013>
65. Singh, A., Misra, V., Thimmulappa, R. K., Lee, H., Ames, S., Hoque, M. O., ... Biswal, S. (2006). Dysfunctional KEAP1–NRF2 Interaction in Non-Small-Cell Lung Cancer. *PLoS Medicine*, 3(10), e420. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030420>
66. Ohta, T., Iijima, K., Miyamoto, M., Nakahara, I., Tanaka, H., Ohtsuji, M., ... Hirohashi, S. (2008). Loss of Keap1 Function Activates Nrf2 and Provides Advantages for Lung Cancer Cell Growth. *Cancer Research*, 68(5), 1303–1309. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5003>
67. Solis, L. M., Behrens, C., Dong, W., Suraokar, M., Ozburn, N. C., Moran, C. A., ... Wistuba, I. I. (2010). Nrf2 and Keap1 Abnormalities in Non-Small Cell Lung Carcinoma and Association with Clinicopathologic Features. *Clinical Cancer Research*, 16(14), 3743–3753. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-3352>
68. Takahashi, T., Sonobe, M., Menju, T., Nakayama, E., Mino, N., Iwakiri, S., ... Wada, H. (2010). Mutations in Keap1 are a potential prognostic factor in resected non-small cell lung cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 101(6), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/jso.21520>
69. Shibata, T., Ohta, T., Tong, K. I., Kokubu, A., Odogawa, R., Tsuta, K., ... Hirohashi, S. (2008). Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1–Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36), 13568–73. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806268105>
70. Wang, R., An, J., Ji, F., Jiao, H., Sun, H., & Zhou, D. (2008). Hypermethylation of the Keap1 gene in human lung cancer cell lines and lung cancer tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373(1), 151–154. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.06.004>
71. Muscarella, L. A., Parrella, P., D'Alessandro, V., la Torre, A., Barbano, R., Fontana, A., ... Fazio, V. M. (2011). Frequent epigenetics inactivation of KEAP1 gene in non-small cell lung cancer. *Epigenetics*, 6(6), 710–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21610322>
72. Sun, Z., Chin, Y. E., & Zhang, D. D. (2009). Acetylation of Nrf2 by p300/CBP Augments Promoter-Specific DNA Binding of Nrf2 during the Antioxidant Response. *Molecular and Cellular Biology*, 29(10), 2658–2672. <https://doi.org/10.1128/MCB.01639-08>
73. Kawai, Y., Garduno, L., Theodore, M., Yang, J., & Arinze, I. J. (2011). Acetylation-Deacetylation of the Transcription Factor Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2) Regulates Its Transcriptional Activity and Nucleocytoplasmic Localization. *Journal of Biological Chemistry*, 286(9), 7629–7640. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.208173>

74. Wang, X., Du, Z., Li, L., Shi, M., & Yu, Y. (2015). Beclin 1 and p62 expression in non-small cell lung cancer: relation with malignant behaviors and clinical outcome. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(9), 10644–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26617774>
75. Schläfli, A. M., Adams, O., Galván, J. A., Gugger, M., Savic, S., Bubendorf, L., ... Berezwoska, S. (2016). Prognostic value of the autophagy markers LC3 and p62/SQSTM1 in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 7(26), 39544–39555. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9647>
76. Sasaki, H., Suzuki, A., Shitara, M., Hikosaka, Y., Okuda, K., Moriyama, S., ... Fujii, Y. (2013). Genotype analysis of the nrf2 gene mutation in lung cancer. *International Journal of Molecular Medicine*, 31(5), 1135–1138. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1324>
77. Kaspar, J. W., Niture, S. K., & Jaiswal, A. K. (2011). Retraction: Antioxidant-induced INrf2 (Keap1) tyrosine 85 phosphorylation controls the nuclear export and degradation of the INrf2–Cul3–Rbx1 complex to allow normal Nrf2 activation and repression. *J. Cell Sci. FASEB J. J. Cell Sci. Two Western Blots from FASEB J. J. Cell Sci*, 125(125), 1027–1038. <https://doi.org/10.1242/jcs.201947>
78. Sasaki, H., Shitara, M., Yokota, K., Hikosaka, Y., Moriyama, S., Yano, M., & Fujii, Y. (2012). MRP3 gene expression correlates with NRF2 mutations in lung squamous cell carcinomas. *Molecular Medicine Reports*, 6(4), 705–708. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.979>
79. Young, L. C., Campling, B. G., Cole, S. P., Deeley, R. G., & Gerlach, J. H. (2001). Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in lung cancer: correlation of protein levels with drug response and messenger RNA levels. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(6), 1798–804. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11410522>
80. Okano, Y., Nezu, U., Enokida, Y., Lee, M. T. M., Kinoshita, H., Lezhava, A., ... Ishikawa, T. (2013). SNP (–617C>A) in ARE-Like Loci of the NRF2 Gene: A New Biomarker for Prognosis of Lung Adenocarcinoma in Japanese Non-Smoking Women. *PLoS ONE*, 8(9), e73794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073794>
81. Ishikawa, T. (2014). Genetic polymorphism in the NRF2 gene as a prognosis marker for cancer chemotherapy. *Frontiers in Genetics*, 5(NOV), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00383>
82. Chen, Z., Ye, X., Tang, N., Shen, S., Li, Z., Niu, X., ... Xu, L. (2014). The histone acetyltransferase hMOF acetylates Nrf2 and regulates anti-drug responses in human non-small cell lung cancer. *British Journal of Pharmacology*, 171(13), 3196–3211. <https://doi.org/10.1111/bph.12661>

83. Tong, Y., Zhang, B., Yan, Y., Fan, Y., Yu, J., & Kong, S. (2017). Dual-negative expression of Nrf2 and NQO1 predicts superior outcomes in patients with non-small cell lung cancer. *Oncotarget*
84. Solis, L. M., Behrens, C., Dong, W., Suraokar, M., Ozburn, N. C., Moran, C. A., ... Wistuba, I. I. (2010). Nrf2 and Keap1 abnormalities in non-small cell lung carcinoma and association with clinicopathologic features. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(14), 3743–53. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-3352>
85. Merikallio, H., Pääkkö, P., Kinnula, V. L., Harju, T., & Soini, Y. (2012). Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2) and DJ1 are prognostic factors in lung cancer. *Human Pathology*, 43(4), 577–584. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2011.05.024>
86. Yang, H., Wang, W., Zhang, Y., Zhao, J., Lin, E., Gao, J., & He, J. (2011). The role of NF-E2-related factor 2 in predicting chemoresistance and prognosis in advanced non-small-cell lung cancer. *Clinical Lung Cancer*, 12(3), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2011.03.012>
87. Qian, Z., Zhou, T., Gurguis, C. I., Xu, X., Wen, Q., Lv, J., ... Wang, T. (2015). Nuclear factor, erythroid 2-like 2-associated molecular signature predicts lung cancer survival. *Scientific Reports*, 5, 16889. <https://doi.org/10.1038/srep16889>
88. Yang, H., Wang, W., Zhang, Y., Zhao, J., Lin, E., Gao, J., & He, J. (2011). The role of NF-E2-related factor 2 in predicting chemoresistance and prognosis in advanced non-small-cell lung cancer. *Clinical Lung Cancer*, 12(3), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2011.03.012>
89. Gañán-Gómez, I., Wei, Y., Yang, H., Boyano-Adánez, M. C., & García-Manero, G. (2013). Oncogenic functions of the transcription factor Nrf2. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 750–764. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.041>
90. Jiang, T., Chen, N., Zhao, F., Wang, X.-J., Kong, B., Zheng, W., & Zhang, D. D. (2010). High levels of Nrf2 determine chemoresistance in type II endometrial cancer. *Cancer Research*, 70(13), 5486–96. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0713>
91. Gao, A.-M., Ke, Z.-P., Wang, J.-N., Yang, J.-Y., Chen, S.-Y., & Chen, H. (2013). Apigenin sensitizes doxorubicin-resistant hepatocellular carcinoma BEL-7402/ADM cells to doxorubicin via inhibiting PI3K/Akt/Nrf2 pathway. *Carcinogenesis*, 34(8), 1806–1814. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt108>
92. Milkovic, L., Zarkovic, N., & Saso, L. (2017). Controversy about pharmacological modulation of Nrf2 for cancer therapy. *Redox Biology*, 12(April), 727–732. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.013>
93. Menegon, S., Columbano, A., & Giordano, S. (2016). The Dual Roles of NRF2 in Cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 22(7), 578–593. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.05.002>

94. Magesh, S., Chen, Y., & Hu, L. (2012). Small Molecule Modulators of Keap1-Nrf2-ARE Pathway as Potential Preventive and Therapeutic Agents. *Medicinal Research Reviews*, 32(4), 687–726. <https://doi.org/10.1002/med.21257>
95. Manna, A., De Sarkar, S., De, S., Bauri, A. K., Chattopadhyay, S., & Chatterjee, M. (2015). The variable chemotherapeutic response of Malabaricone-A in leukemic and solid tumor cell lines depends on the degree of redox imbalance. *Phytomedicine*, 22(7), 713–723. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.05.007>
96. Zhong, H., Xiao, M., Zarkovic, K., Zhu, M., Sa, R., Lu, J., ... Yin, H. (2017). Mitochondrial control of apoptosis through modulation of cardiolipin oxidation in hepatocellular carcinoma: A novel link between oxidative stress and cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, 102, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.494>
97. Leinonen, H. M., Ruotsalainen, A.-K., Laitinen, H. M., Kuosmanen, S. M., Kansanen, E., Pikkarainen, J. T., ... Levonen, A.-L. (n.d.). Oxidative Stress-Regulated Lentiviral TK/GCV Gene Therapy for Lung Cancer Treatment. *Therapeutics, Targets, and Chemical Biology*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1166>
98. Bobilev, I., Novik, V., Levi, I., Shpilberg, O., Levy, J., Sharoni, Y., ... Danilenko, M. (2011). The Nrf2 transcription factor is a positive regulator of myeloid differentiation of acute myeloid leukemia cells. *Cancer Biology & Therapy*, 11(3), 317–329. <https://doi.org/10.4161/cbt.11.3.14098>
99. Zhan, L., Zhang, H., Zhang, Q., Woods, C. G., Chen, Y., Xue, P., ... Pi, J. (2012). Regulatory role of KEAP1 and NRF2 in PPAR γ expression and chemoresistance in human non-small-cell lung carcinoma cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 53(4), 758–68. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.041>

Životopis

Rođen sam u Splitu 1992. godine, gdje pohađam osnovnu i srednju Zdravstvenu školu. Tokom osnovnoškolskog i srednjoškolskog obrazovanja aktivno treniram jedrenje u JK Labud i natječem se na brojnim domaćim i međunarodnim regatama. 2011. godine završavam srednjoškolsko obrazovanje i stječem zvanje farmaceutskeg tehničara i iste godine upisujem Medicinski fakultet u Zagrebu.

Tokom studiranja aktivno sudjelujem u brojnim izvannastavnim aktivnostima na fakultetu poput demonstratura iz anatomije i propedeutike; aktivan sam član CroMSIC-a te tri puta odlazim na studijske razmjene u Italiju, Egipat i Rusiju.

2016. godine postajem suradnik na projektu „Uloga akvaporina u adaptaciji na kronični oksidacijski stres matičnih stanica karcinoma dojke“ pod vodstvom dr.sc. Ane Čipak Gašparović; Laboratorij za oksidacijski stres, Institut Ruđer Bošković.

Dobitnik sam rektorove nagrade u akademskoj godini 2016./2017. za znanstveni rad: „Oksidacijske modifikacije izvanstaničnog matriksa induciraju Nrf2 u matičnim stanicama karcinoma dojke“.

Studij završavam izvrsnim uspjehom.